5. 1 アッセイの概要

ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイは，以下の実験ステージにより行われます.

ステージ	操作の説明	所要時間
A	● ターミナルトランスフェラーゼおよびDIG-ddUTPを用い，二本鎖オリゴヌクレオチドプローブやDNAフラグメント(30〜100塩基が理想的なサイズ)の 3'末端をラベルします[1]. ● DIGラベルされたプローブを定量します[2].	15分間 約 2 時間
B	DIGラベルされたオリゴヌクレオチド(タンパク結合シークェンスを含む)を細胞抽出液または部分的に精製されたDNA結合性タンパク(コントロールのファクターOct2Aなど)とインキュベートします[1]. ***ノート：***競合DNA[ポリ d(A-T)またはポリ d(I-C)]を添加することで，特に細胞抽出試料中における非特異的なDNA-タンパク複合体の形成を防ぎます.	15分間
C	ネガティブ(非変性)ポリアクリルアミドゲルで, 0.5 × TBEバッファーを用い，70 Vにてアッセイの混合物を分離します. ***ノート：***Novex社製の 5 × High-Density TBE Sample Buffer (LC6678)，プレキャスト 6% DNA Retardation Gel (EC6365]，および XCell II Mini Cell (E19001)の使用をお薦めします.	50〜60分間
D	0.5 × TBEバッファー中にて 30 Vでのエレクトロブロッティングにより，分離産物をポジティブチャージのナイロンメンブレンへトランスファーします. ***ノート：***Novex社製のXCell II Blot Module(E19051)の使用をお薦めします.	1 時間
E	DIGラベルされたDNA-タンパク複合体を, アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体およびCSPDアルカリホスファターゼ化学発光基質を用いて検出します[2]. ***ノート：***検出操作には, DIG Wash and Block Buffer Setも使用されます.	およそ 2.5時間
F	X-線フィルムまたはイメージャーを用いて化学発光のシグナルを記録します.	5〜20分間

1 ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイ操作の詳細については，DIG Gel Shift Kit, 2nd generation Cat. No. 3 353 591 の取扱説明書を参照ください.
この取扱説明書は，弊社のウェブサイト(http：//www.roche-applied-sciene.com)でもご覧いただけます.
試薬はDIG Gel Shift Kit の内容物として含まれています.
2 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章のセクション 4.1を参照ください.